



1646
Attorney's Docket No.: 06501-057001 / C2-906DP1PCT-US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Jun-ichi Nezu et al.
Serial No. : 09/521,195
Filed : March 7, 2000
Title : TRANSPORTER GENES

Art Unit : Unknown
Examiner : Unknown

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

RECEIVED
MAR 14 2001
TECH CENTER 1600/2900

1600
DB
3/15

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 from Japanese Application Nos. 10/156660 filed May 20, 1998 and 9/260972 filed September 8, 1997. A certified copy of each application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date:

3-7-01

John T. Li
Reg. No. 44,210

John T. Li

Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, MA 02110-2804
Telephone: (617) 542-5070
Facsimile: (617) 542-8906

20179833.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Date of Deposit

March 8, 2001

Signature

Jeanine Mecherkany

Jeanine Mecherkany

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate



日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 5月20日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第156660号

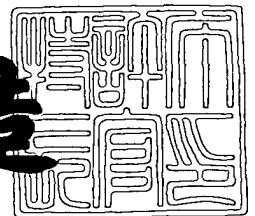
出 願 人
Applicant(s):

株式会社中外分子医学研究所

2001年 2月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3006156

【書類名】 特許願

【整理番号】 C2-906DP1

【提出日】 平成10年 5月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 トランスポーター遺伝子

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 根津 淳一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 奥 飛鳥

【特許出願人】

【識別番号】 596102791

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代表者】 大杉 義征

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成 9年特許願第260972号

【出願日】 平成 9年 9月 8日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716403

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスポーター遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：2 に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項 3】 配列番号：3 に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項 4】 配列番号：4 に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項 5】 請求項 1 または 3 に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項 6】 配列番号：2 に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 7】 配列番号：4 に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 8】 請求項 5 から 7 のいずれかに記載のDNAが挿入されたベクター。

【請求項 9】 請求項 5 から 7 のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 11】 配列番号：1 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に

結合する抗体。

【請求項 12】 配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞外から細胞内へ、あるいは細胞内から細胞外への物質の輸送に関与するタンパク質であるトランスポーターに関する。

【0002】

【従来の技術】

栄養素や内因性物質の細胞内への取り込み機構において、生体膜に存在する多種の輸送担体（トランスポーター）の関与と、その輸送機構が最近明らかになりつつある(Tsuiji, A. and Tamai, I., Pharm. Res., 13, 963-977, 1996.)。これらのトランスポーターには、輸送される物質の構造認識能が備わっており、物質を選択的に輸送するが、比較的その構造認識が広いトランスポーターの場合、本来は生体異物である医薬品などについても誤認識し、積極的に細胞内へ輸送してしまうと考えられる。基本的に薬物の生体膜透過は、その分子サイズ、脂溶性、水素結合能などの物理化学的特性に依存する単純拡散に従っており、特にイオン性薬物の場合には、非解離型分子のみがpH-分配仮説に従って生体膜を透過すると考えられていた。しかし、細胞内外の効率的な物質交換活性が必要な小腸、腎尿管、胎盤、脳脈絡叢の上皮細胞や、肝実質細胞、血液脳関門などでは、多くの薬物は単純拡散以外の特異的機構、つまりトランスポーターによる能動的な輸送により細胞膜を透過することが明らかとなってきた(玉井郁巳、辻彰：ファルマシア、31、493-497、1995.、齋藤秀之、乾賢一：医学のあゆみ、179、393-397、1996.、玉井郁巳：薬物動態、11、642-650、1996.)。例えば、非エステル型の経口用 β -ラクタム抗生物質は生理的pHにおいては両性または負に荷電し、脂溶性は極めて低いにも関わらず、腸管からの吸収は良好であることが知られている。単離膜小胞系を用いた輸送研究により、これらの薬物の吸収過程には、刷子縁膜に局在する H^+ 駆動型ペプチドトランスポーターが関与していることが示される

ようになった(Okano, T. et al., J. Biol. Chem. 261, 14130-14134, 1986.)。ペプチド輸送系は、ジあるいはトリペプチドを認識するが、テトラペプチド以上は認識できず、ペプチドサイズについては極めて厳密であるものの、非天然のアミノ酸からなるペプチドは認識するといった比較的広い基質認識性を持つ。β-ラクタム抗生物質のペプチドトランスポーターによる輸送も、やはりこの広い基質認識性ゆえの誤認識による輸送であり、臨床的にはそれを図らずも利用していたことになる(Tsuji, A., American Chemical Society (eds. Taylor, M. D., Amidon, G. L.), Washington, D. C., 101-134, 1995.)。さらには、脂溶性の高い脂肪酸のような物質の生体膜透過においても、トランスポーターが関与している可能性が報告されている(Schaffer, J. and Lodish, H., Cell, 79, 427-436, 1994.)。

【0003】

ところで、様々なトランスポーターは各臓器、細胞が持つ生理的役割に応じて備わっているはずであり、その分布や機能には臓器特異性が期待される。従って、薬物動態に臓器選択性をもたらす手法としてトランスポーターを利用することが期待できる。すなわち、トランスポーターを利用した臓器特異的薬物デリバリー(DDS)が可能であると考えられる。また、脂溶性をあげることによる単純拡散に頼った薬物の吸収性改善は、肝臓における初回通過効果を増大させたり、臓器移行性を非特異的に増大させる可能性が高い。しかし、トランスポーターの基質特異性を利用したドラッグデザインを行うことにより、脂溶性とは無関係に薬物の吸収性を高めることも可能であると考えられる(林喜代美 他: Drug Delivery System, 11, 205-213, 1996.)。このような目的のためには、多くのトランスポーターを分子レベルで同定し、その性質についての詳細な解析を行うことが必須であるが、トランスポーターはその生化学的な取り扱いの難しさと、機能測定 of 複雑さから、膜生理学的な研究の多さに比較し、分子レベルでの同定が非常に遅れている。

【0004】

最近になり、外来遺伝子発現系であるアフリカツメガエル(Xenopus)卵母細胞を用いた発現クローニング法によりいくつかのトランスポーターのcDNAがクロー

ニングされるようになり、構造上の類似性が存在することが明らかになってきた (Fei, Y. -J. et al., *Nature*, 368, 563-566, 1994.)。例えば、1994年にKoepsellらによって、基底膜型と推定される有機カチオントランスポーターOCT1が発現クローニング法によってクローニングされた (Grundemann, D. et al., *Nature*, 372, 549-552, 1994.)。その後、OCT1の配列をもとにしたホモロジークローニングによってOCT2が同定された (Okuda, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 500-507, 1996.)。OCT1とOCT2はお互いに67%という非常に高い相同性を示すが、その尿細管における分布は異なっており、OCT2は主に管腔側に局在していると考えられている (Grundemann, D. et al., *J. Biol. Chem.* 272, 10408-10413, 1997.)。両者とも腎臓に強い発現が見られるが、OCT1の場合はそれ以外にも肝臓、結腸、小腸に発現が存在するのに対し、OCT2は腎臓に特異的であり、組織分布も異なっている。

【0005】

トランスポーターについての分子レベルでの同定については、これら報告例を含めわずかであり、いまだ臨床上有用な多くの未知のトランスポーターが存在していると考えられる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なトランスポーター遺伝子およびそのタンパク質を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、胎児組織に特異的、あるいはより強く発現している遺伝子 (fetal gene) の中には、癌をはじめとする各種疾患に関与する遺伝子が存在するとの作業仮説のもと、サブトラクション法によって作製した胎児遺伝子 (fetal gene) ライブラリーのランダムシーケンシングによるスクリーニングを行ってきた。本発明者等はこの過程において、有機カチオントランスポーターOCT1およびOCT2と有意な相同性を示す未知の遺伝子の存在を見いだした。この遺伝子が新規のトランスポーターをコードしていることが予想されたことから、本発明者等は、

その単離を試みた。その結果、ヒト胎児由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより目的の遺伝子を単離することに成功した。さらに、本発明者等は、単離した遺伝子がコードするタンパク質のトランスポーター活性につき検討を行った。その結果、該タンパク質が実際に種々の有機カチオンのトランスポーターとして機能することを見いだした。

【0008】

即ち、本発明は、新規なトランスポーターに関し、より具体的には、

(1) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(2) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(3) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(4) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、

(5) (1)または(3)に記載のタンパク質をコードするDNA、

(6) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA、

(7) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA、

(8) (5)から(7)のいずれかに記載のDNAが挿入されたベクター、

(9) (5)から(7)のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体、(10) (9)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)から

(4)のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、

(11) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗

体、

(12) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に結合する抗体、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明は、新規なトランスポータータンパク質に関する。本発明者等が単離した新規なヒトトランスポーターcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：2および配列番号：4に示す。また、これらcDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1および配列番号：3に示す。本発明のトランスポータータンパク質に含まれるこれら2つのタンパク質のアミノ酸配列は全体に渡り、76%程度という非常に高い相同性を示し、ともにグルコーストランスポーターなど様々なタイプのトランスポーターに存在するコンセンサス配列 [Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly]-Xaa<2>-[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala]-[Asp, Glu]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala] (Maiden, M. C. et al., Nature, 325, 641-643, 1987.)を保持していた。実際に、これらタンパク質は、様々な有機カチオンを輸送する活性を有していた。

【0010】

本発明のトランスポータータンパク質としては、有機カチオンを輸送する活性を有すれば足り、該活性を有する限り有機カチオン以外の他の物質を輸送する活性をさらに有するものも含まれる。有機カチオンとしては、これらに制限されないが、例えば、TEA、カルニチン、キニジン、ピリラミンが挙げられる。また、抗がん剤であるアクチノマイシンD、エトポシド、ビンブラスチン、ダウノマイシンなどが挙げられる。本発明のトランスポータータンパク質としては、細胞外から細胞内へ有機カチオンを輸送する活性を有するもののみならず、細胞内から細胞外へ有機カチオンを輸送する活性を有するものも含まれる。

【0011】

本発明のトランスポータータンパク質は、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組換

えタンパク質は、例えば、後述するように本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。一方、天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述の本発明の抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、本発明のタンパク質の発現の高い腎臓やHeLa S3などの癌細胞株から単離することが可能である。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体であれば、例えば、本発明のタンパク質をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞にし、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のタンパク質に対する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティークラムなどにより精製することで調製することが可能である。なお、得られた抗体を人体に投与する目的で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト型化抗体またはヒト抗体を用いると有効である。抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部位を既存のヒト抗体に移植するCDR graft法などが挙げられる。また、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウスを免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製こともできる。

【0012】

また、当業者であれば、公知の方法を用いて配列番号：1または3に記載のトランスポータータンパク質中のアミノ酸の置換などを適宜行い、これらと同等の機能を有するタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミ

ノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加により配列番号：1または3に記載のタンパク質に対してアミノ酸配列が改変された改変体であって、配列番号：1または3に記載のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。ここで「同等の機能を有する」とは、タンパク質が有機カチオンを輸送する活性を有することを指す。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland)、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367)、Kunkel法 (*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)) などが挙げられる。なお、アミノ酸の置換は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。置換、欠失、付加がなされる部位は本発明のタンパク質の活性が保持される限り特に制限はない。タンパク質のトランスポーター活性は、例えば、後述の実施例6に記載の方法により検出することが可能である。

【0013】

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., *Molecular Cloning* 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) などを用いて、配列番号：2または4に記載のDNA配列（またはその一部）を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質を得ることも常套手段である。即ち、当業者であれば、配列番号：2または4に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：1または3に記載のトランスポータータンパク質と同等の機能を有するタンパク質を調製することが可能であり、これらのタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。ここで「同等の機能を有する」とは、上記と同様に、タンパク質が有機カチオンを輸送する活性を有することを指す。ハイブリダイズするDNAを他の生物から単離する場合には、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウシなどが用いられ、特に腎臓などの組織が単離に適している。これにより単離される配列番号：1または3に記載のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAは、通常、配列番号：2または配列番号：4に

記載のDNAと高い相同性を有する。高い相同性とは、配列番号：2または配列番号：4に記載のDNAと、少なくとも70%以上、好ましくは少なくとも80%以上、さらに好ましくは少なくとも90%以上の配列の同一性を指す。

【0014】

このようなDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件の例を示せば、以下の如くである。即ち、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、37℃から55℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行う。より好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、60℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、60℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行う。さらに好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、0.1xSSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行う。

【0015】

また、本発明は、上記本発明のトランスポータータンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、cDNAでも、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、上記のように配列番号：1または3に記載のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質を単離するために用いる他、本発明のタンパク質を組換えタンパク質として生産するために利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：2または4に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用い

る細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌 (E.coli) が挙げられる。また、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3 (Invitrogen社製) やpEF-BOS (Nucleic Acids.Res.1990,18(17),p5322) などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」 (GIBCO BRL社製) などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」 (Invitrogen社製) などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1 (Pharmacia社製)、「QIAexpress system」 (Qiagen社製) などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP (ベーリンガーマンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法など用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

【0016】

本発明のDNAは、また、本発明のタンパク質の活性異常や発現量異常に起因する疾患に対する遺伝子治療に用いることも可能である。遺伝子治療に用いる場合には、本発明のDNAをアデノウイルスベクター (例えば、pAdexLcw) やレトロウイルスベクター (例えば、pZIPneo) などに挿入して、生体内に投与する。投与方法は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。また、アンチセンス合成DNAを生体内に直接、または上記ベクターに挿入して投与して治療を行うことも可能である。

【0017】

本発明の応用として、本発明のトランスポータータンパク質を利用した、薬物の体内吸収、体内動態の制御が挙げられる。本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を詳細に解析することにより、このトランスポーターによって輸送され得る薬剤のドラッグデザインが可能であり、これにより本発明のトランスポータータンパク質を介して薬物の体内吸収を高めることができると考えられる。デザインされる薬物には従来の脂溶性をあげるような修飾は不要であるため、

水溶性の扱いやすい薬物が迅速かつ効率的に開発できるようになると考えられる。また開発された薬物の吸収は基本的に本発明のトランスポータータンパク質の生体内分布に従うと考えられるため、臓器特異的な薬物の送達が可能である。特に本発明のトランスポータータンパク質の体内分布が、標的臓器と一致するような薬物の場合、理想的なドラッグデリバリーシステム(DDS)となると考えられる。また、他のトランスポーターによる薬物の吸収を期待しているが、本発明のトランスポータータンパク質による吸収は望ましくない場合、本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を考慮に入れたドラッグデザインを行うことにより、他のトランスポータータンパク質に選択的な薬物の創造が行えると考えられる。本発明のトランスポータータンパク質は腎臓に存在するため、逆に本発明のトランスポータータンパク質によって体外へ排出されやすい薬物を設計することにより、腎毒性等を軽減することも可能である。

【0018】

また、本発明の応用として、本発明のトランスポータータンパク質そのものを標的とした薬物の開発も考えられる。栄養物質や薬物の吸収機構として、あるいは薬物や生体内代謝物の排泄機構としてのトランスポーターの重要性を考えると、その機能が損なわれること、または異常に亢進することに起因する疾患が存在する可能性が考えられる。そのような疾患に対しては、本発明のトランスポータータンパク質の機能を阻害、あるいは亢進する薬剤や、本発明のトランスポーター遺伝子の発現量や、タンパク量を調節するするような薬剤が効果的であろう。また、上記のような遺伝子治療も有効である。

【0019】

また、本発明のトランスポータータンパク質に含まれるOCTN2は、カルニチンを効率よく輸送する活性を有するため、低カルニチン血症を原因とする脂肪肝などの病態に対し、OCTN2の活性を制御する化合物による治療、あるいはOCTN2遺伝子を用いた遺伝子治療等が有効であると考えられる。

【0020】

本発明のトランスポータータンパク質は種々の癌細胞株において発現しており、腫瘍細胞において本発明のトランスポータータンパク質が薬物を細胞内へ輸送

し得る可能性がある。この場合には、本発明のトランスポータータンパク質によってより吸収されやすい抗腫瘍薬が創造できると考えられる。あるいは逆に、本発明のトランスポータータンパク質による物質の細胞外へ輸送、排出する機構が、腫瘍細胞においては抗腫瘍剤の排出として働き、腫瘍細胞が薬剤に対する抵抗性を獲得する可能性も考えられる。本発明のトランスポータータンパク質が腫瘍の薬剤耐性機構に関与しているならば、本発明のトランスポータータンパク質阻害剤を抗腫瘍剤と併用することにより、抗腫瘍効果を強化できると考えられる。

【0021】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0022】

【実施例】

【実施例1】 サブトラクションライブラリーの作製

サブトラクションライブラリーはPCR-SelectTM cDNA Subtraction kit (CLONTech社製)を用い、Luda Diatchenkoらの方法(Diatchenko, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6025-6030, 1996.)に基本的に従って作製した。

【0023】

まずヒト胎児肝臓由来polyA⁺ RNA及びヒト成人肝臓由来polyA⁺ RNAよりMMLV逆転写酵素を用いた標準的な方法で二本鎖cDNAを合成した。つぎにT4 DNAポリメラーゼによりこのcDNA末端を平滑化し、さらにRsaIにより切断した。胎児肝臓由来cDNA(テスター)の一部を2分割し、アダプター1とアダプター2(表1)をそれぞれ別々にライゲートした。これにそれぞれ120倍量の成人肝臓由来cDNA(ドライバー)を加え、熱変性を行ったあと68℃で8時間の1次ハイブリダイゼーションを行った。つぎにこれを熱変性せずに混合し、さらに熱変性した過剰量のドライバーを加え68℃で約16時間の2次ハイブリダイゼーションを行った。これを希釈用バッファーにて希釈し、75℃で7分インキュベートし、アダプターの短い方の鎖を取り除いたものをPCRの鋳型として用いた。アダプターに対応するプライマーであるPCRプライマー1(5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3' /配列番号: 5)、2(5' TGTAGCGTGAAGACGACAGAA 3' /配列番号: 6)を用いたPCRを行うことにより、両

端に異なるアダプターを持ったcDNA（サブトラクトされたcDNA）のみを選択的に増幅した（サプレッションPCR）。これの一部を鋳型とし、PCRプライマー1、2のさらに内側に位置するプライマーであるNested PCRプライマー1（5' TCGAGCGGCC GCGGCGGCAGGT 3' / 配列番号：7）と2（5' AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT 3' / 配列番号：8）を用いたPCRを行うことにより、さらに選択性を増した生成物を得た。この生成物をQIAquick PCR Purification kit(QIAGEN社製)を用いて精製し、pT7Blue-Tベクター(Novagen社製)にTAクローニング法によりクローニングし、サブトラクションライブラリーとした。

【0024】

【表1】

アダプター1	5' CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCGGCGGCAGGT 3'
	3' GCGGCGTCCA 5'

アダプター2	5' TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT 3'
	3' GCCTCCCGCCA 5'

【実施例2】 cDNAクローニング

胎児遺伝子の解析を目的に、胎児肝臓由来サブトラクションライブラリーの、ランダムシーケンシングによるスクリーニングを行った。得られたEST(Expressed Sequence Tag)のホモロジーサーチ(Blastx)による解析から、既知の有機カチオントランスポーターであるOCT1(Grundemann, D. et al., Nature, 372, 549-552, 1994.)、OCT2(Okuda, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 224, 500-507, 1996.)と有意な相同性を示すアミノ酸配列をコードするクローン、OC TN1(fl1s631)(292bp)が見いだされた。このクローンの配列は新規なものであり、新規のトランスポーター遺伝子由来の断片である可能性が推測されたことから、この遺伝子の全オープンリーディングフレーム(ORF)を含むcDNAのクローニングを行った。

【0025】

胎児肝臓由来サブトラクションライブラリーより得られたOCTN1オリジナルクローンをプローブとし、human fetal liver 5'-stretch cDNAライブラリー (CLONTECH社製) のスクリーニングを行った。OCTN1オリジナルクローンのインサートを、M13 P4-22とM13 P5-22を用いたPCRにより増幅し、これをReady-to Go DNA labelling beads (Pharmacia社製) を用いたランダムプライマー法により [α - 32 P] dCTPでラベルし、プローブとした。ハイブリダイゼーションはExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH社製) 中、68℃で、メーカー推奨の方法に従い行った。また、最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1% SDS、50℃で行った。約 5×10^5 個のファージクローンをスクリーニングしたところ、最終的に7個の陽性クローンが単離された。これらのクローンのインサートcDNAを λ gt10ベクターの配列より設計したベクタープライマー (GT10 S1 5' CTTTGTGAGCAAGTTCAGCCT 3' / 配列番号: 9, GT10 A1 5' AGAGGTGGCTTATGAGTATTTCTT 3' / 配列番号: 10)、あるいは解読されたcDNAの配列より設計したプライマーを用いたPCRによって増幅し、その産物を直接シーケンシングすることにより、塩基配列を決定した。一部の増幅が困難な領域については7-deaza dGTPを基質塩基として用いたPCRによる増幅を行った (McConlogue, L. et al., Nucleic Acids Res. 16, 9869, 1988.)。

【0026】

約 5×10^5 個のファージクローンをスクリーニングしたところ、最終的に7個の陽性クローンが単離された。これらのクローンのインサートcDNAの塩基配列を決定した結果、OCTN1遺伝子は、551アミノ酸 (推定分子量約62,000) からなるORFをコードし得る配列を持つことが明らかとなった。この全アミノ酸配列を用いてデータベースサーチを行ったところ、全体に渡ってOCT1及びOCT2と有意な相同性 (約34%) を示すことが確認された。また、Kyte & Doolittleの計算式 (Kyte, J. and Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. 157, 105-132, 1982.) によって得られる疎水性プロファイルは、OCT1およびOCT2のものと非常に類似しており、11-12個の膜貫通領域と思われる疎水性領域が認められた (図1)。また、この配列中には1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列 ([Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly] - [Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly] - Xaa<2> - [Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala] - [Asp, Glu] - Xaa - [Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp,

Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala]) が存在した(160-175)。このコンセンサス配列は、哺乳類細胞におけるグルコースのトランスポーターであるGLUT1~GLUT7に存在するコンセンサス配列であり、グルコーストランスポーター以外にも、様々なタイプのトランスポーターに存在することが知られている(Maiden, M. C. et al., *Nature*, 325, 641-643, 1987.)。OCTN1のアミノ酸配列中には、さらに、N型糖鎖が付加され得る配列(N-X-[ST])が4箇所(57-59, 64-66, 91-93, 304-306)見られる。また、プロテインキナーゼCによるリン酸化を受け得るサイト([ST]-X-[RK])も5箇所(164-166, 225-227, 280-282, 286-288, 530-532)存在した。さらに、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列([Ala, Gly]-Xaa(4)-Gly-Lys-[Ser, Thr])も存在する。このATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列はキナーゼやrasファミリータンパク等のATP結合タンパク、あるいはGTP結合タンパク質に存在し、この部位にATP, GTPが結合することが知られている(Walker, J. E. et al. *EMBO J.*, 1, 945-951, 1982)。また、ABC(ATP Binding Cassette)型トランスポーターと呼ばれるトランスポーターにはこの配列が存在し、ATPを加水分解することによるエネルギーを用いて物質を輸送していることが示されている(Higgins, C. F. et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22, 571-592, 1990; Urbatsch, I. L. et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 26956-26961, 1995))。このコンセンサス配列の存在により、OCTN1タンパク質がATPあるいはGTP依存的な輸送を行うトランスポーターである可能性も考えられる。

【0027】

なお、塩基配列の決定は、アルカリSDS法によって調製したプラスミドDNA、またはコロニーPCRなどによるPCR産物を鋳型とし、ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With AmplyTaq DNA Polymerase,FSを用いたサイクルシーケンシング法により行い、ABI 377 DNA Sequencer (PerkinElmer社製)により解読した。コロニーPCRは、ベクタープライマーであるM13 P4-22(5' CCAGGGTTTCCCAGTCACGAC 3' / 配列番号: 11)及びM13 P5-22(5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3' / 配列番号: 12)を含むPCR反応溶液の中に、組み換え体を持つコロニーを直接懸濁することにより行った。PCR反応後、増幅されたインサートDNAから、ゲル濾過法などにより未反応のプライマー、ヌクレオチド等を除き

、シーケンシングの鋳型として用いた。

【0028】

〔実施例3〕 ノーザン解析

OCTN1の組織分布をノーザン解析により調べた(図2)。OCTN1の3'側断片(約1,100番目の塩基より後半)を、Ready-to Go DNA labelling beads (Pharmacia社製)を用いたランダムプライマー法により $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTPでラベルし、プローブとして用いた。Multiple Tissue Northern (MTN) Blot - Human, Human III, Human IV, Human Fetal II, Human Cell line (CLONTECH社製)を用い、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH社製)中で、メーカー推奨の方法に従い、68℃でハイブリダイゼーションを行った。最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1% SDS、50℃で行った。その結果、胎児では肝臓に、そして成人由来の臓器では、腎臓、骨髄、気管に約2.5kbの強い発現が観察された。それ以外には胎児の腎臓、肺、そして成人の骨格筋、肺、胎盤、前立腺、脾臓、脊髄に弱い発現が見られた。また、腫瘍細胞株においてもHela S3、K562、SW480、A549に発現が認められ、特にHela S3においては非常に強く発現していることが明らかとなった。

【0029】

〔実施例4〕 OCTN2のcDNAクローニング

OCTN1の全塩基配列を用いたデータベースサーチより、ヒト5番染色体q領域由来P1ファージクローン(P1 H24クローン。GenBank accession No.L43407, L43408, L46907, L81773, L43409)の塩基配列の一部に、OCTN1の配列と非常に類似した配列が含まれていることを見いだした。OCTN1の塩基配列と類似性がある部分は、全く類似性を持たない配列によって分断されているが、これをOCTN1の配列を参考にすることにより連結してみると、OCTN1と広い領域に渡って高い相同性を持つ配列になることがわかった。このことから、OCTN1ホモログが存在することが示唆された。しかしデータベースに登録されているゲノム配列は全コーディング領域をカバーしていない不完全なものであったため、この配列からだけでは、そこにコードされるタンパク質の完全な構造を知ることは不可能であった。そこでこのOCTN1ホモログ遺伝子(OCTN2)のcDNAクローニングを行い、コードされるタンパクの構造を決定した。まず、これらのP1ファージクローンの配列より63

1R S4プライマー(5' GTGCTGTTGGGCTCCTTCATTTC 3' / 配列番号: 13)及び631R A1プライマー(5' AGCTGCATGAAGAGAAGGACACTG 3' / 配列番号: 14)を作製し、ヒト成人腎臓由来polyA⁺ RNA (CLONTECH社製)より合成したcDNAを鋳型に、94℃で3分、「94℃で30秒、58℃で1分、72℃で2分」を35サイクル、72℃で10分という条件によるPCRを行ったところ、約900bpの断片が増幅された。この断片をpT7Blue-Tベクター (Novagen社製)にTAクローニング法によりサブクローニングし、塩基配列を決定したところ、全体に渡りOCTN1と非常に高い相同性を有することが明らかとなった。そこでこの遺伝子をOCTN2と命名し、さらに長いcDNAのクローニングを行った。

【0030】

このクローンのインサートをプローブとして用い、OCTN1 cDNAクローニングの場合と同様な方法でヒト腎臓由来cDNAライブラリーをスクリーニングし、より長いクローンを単離していく操作、及びRACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法 (Chenchik, A., Moqadam, F., and Siebert, P. (1995) CLONTECHniques X, 5-8) 等により、OCTN2の全コーディング領域を含むcDNAをクローニングしその構造を決定した(配列番号: 3)。RACE法は具体的には、次のように行った。631R S6プライマー(5' AGCATCCTGTCTCCCTACTTCGTT 3' / 配列番号: 15)を作製し、ヒト成人腎臓由来Marathon-ReadyTM cDNA (CLONTECH社製)を鋳型として、94℃で2分、「94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分」を35サイクル、72℃で10分という条件のPCRを行ったところ、約1.7kbpの3'側cDNA断片が増幅され、これをpT7Blue-TベクターにTAクローニング法によりサブクローニングし、構造を決定した。

【0031】

OCTN2は557アミノ酸からなるORFをコードしていることが明らかとなった。OCTN1とOCTN2のアミノ酸配列の比較を図3に示す。両者は全体に渡り、約76%という非常に高い相同性を示した。またOCTN2アミノ酸配列中にはOCTN1と同様に1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列(160-176)が存在した。これらのことから、OCTN2はOCTN1と構造上の関連を持った新規トランスポーターである可能性が示唆された。また、OCTN2アミノ酸配列中にも、OCTN1と同様にATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列(218-225)が存在した。

【0032】

[実施例5] ノーザン解析

631R S4プライマー(5' GTGCTGTTGGGCTCCTTCATTTCA 3' / 配列番号: 13)及び631R A1プライマー(5' AGCTGCATGAAGAGAAGGACACTG 3' / 配列番号: 14)を用いたPCRによって得られた約900bpのOCTN2 cDNAをプローブとし、OCTN1と同様にノーザン解析を行った。その結果を図4に示す。発現パターンはOCTN1のパターンと重複している部分があるが、胎児組織において腎臓に非常に強い発現が見られる点が特に異なっていた。また、OCTN2もまたK-562, HeLaS3, SW480等の癌細胞株で強く発現していることが判明した。これらの癌細胞において、OCTN1, OCTN2が抗癌剤などの物質の輸送に関与している可能性が示唆される。

【0033】

[実施例6] OCTN1のヒト胎児腎臓細胞(HEK293)での強制発現と活性測定

ブランクハイブリダイゼーションによるスクリーニングによって得られた陽性ファージクローンより、QIAGEN Lambda Kit(QIAGEN社製)を用いてファージDNAを抽出した。インサートDNAをpUC18ベクターにサブクローニングした後、SmaI及びEcoRIで切り出される全ORFを含むcDNAを、哺乳類細胞用の発現ベクターであるpcDNA3(Invitrogen社製)のEcoRIサイトと、平滑末端化したHindIIIサイトとの間へ組み込み、発現用プラスミドDNA、「pcDNA3/OCTN1」を得た。プラスミドDNAは、QIAGEN PLASMID MAXI Kit(QIAGEN社製)を用いたアルカリ-SDS法で調製した。

【0034】

pcDNA3/OCTN1、及びコントロールとしてインサートを含まないpcDNA3ベクターを、リン酸カルシウム法によりヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293細胞に導入した。すなわち、プラスミドDNA10 μ g、Hepes緩衝液(137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HPO₄, 6mM Dextrose, 21mM Hepes pH7.1)1ml、2M CaCl₂ 62.5 μ lを混合し、30分以上室温で静置することによりリン酸カルシウム共沈物を生成させた。10cmプレート1枚あたり1.5 x 10⁶個の細胞を蒔き、24時間培養した後、先のリン酸カルシウム共沈物を加え24時間培養し、その後PBS(Phosphate buffered saline)でプレートを洗浄し、培地を加えさらに24時間培養した。

【0035】

プラスミドDNAを導入した細胞、あるいは未処理の細胞を用いて以下の手順に従ってトランスポート実験を行った。プレートからラバーポリスマンを用いて細胞をはがし、トランスポート緩衝液(125mM NaCl, 4.8mM KCl, 5.6mM (+)-glucose, 1.2mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, 25mM Hepes pH7.4)に懸濁し、20分間プレインキュベーションを行った。ついで各種基質のラベル体([¹⁴C] TEA<テトラエチルアンモニウム>(NEN)、[³H] カルニチン<L-カルニチン ヒドロクロリド>(Amersham社製)、[³H] PCG<ベンジル ペニシリン>(Amersham)、[³H] キニジン(ARC)、[³H] ピリラミン<メピラミン>(Amersham社製))を適当量添加し、37℃にて一定時間インキュベートを行った。これを、3M KCl層の上にシリコンオイルと液体パラフィンの混合物(比重=1.022)を重層して作製したシリコンレイヤー上に重層し、遠心することにより細胞を分離した。細胞の放射活性を測定し、細胞内へのトランスポート能とした。なお、この際、1 × 10⁶個の細胞を1ポイントとして用いた。また、HEK293細胞の培養は、ダルベッコMEM, 10% FCS(ウシ胎児血清)を培地とし、5% 二酸化炭素中、37℃で行った。

【0036】

まず、TEAを基質として用い、pcDNA3/OCTN1を導入した細胞と、未処理の細胞におけるトランスポーター能を測定した(図5)。その結果、反応時間に依存した明らかなOCTN1導入細胞内へのTEAの取り込みが観察された。この取り込みは、未処理細胞においては見られなかった。次に、この系にラベル体ではないTEAを添加することによるゴールドインヒビションの実験を行った(図6)。加えるゴールドのTEAの濃度に応じて明らかな見かけ上の取り込みの低下が観察された。この実験においてはインサートを含まないpcDNA3ベクターを導入した細胞(Mock)をコントロールとしたが、未処理の細胞を用いた場合と同様に、ほとんど細胞内への基質の取り込みは認められず、この取り込み現象がOCTN1を導入したことによることが明らかとなった。次に、OCTN1のTEAに対するK_m(ミカエリス定数)値を求めるために、様々な濃度の[¹⁴C] TEAを加えた場合の取り込み量を測定した(図7)。OCTN1を導入した細胞における取り込み量からMockの取り込み量を差し引いた正味の取り込み量をLineweaver-Burk逆数プロットすることにより、K_m値は0.44 ± 0.04mMであることが求められた。また反応の最大速度V_{max}は6.68 ± 0.34

(nmol/3 min/mg)であることが求められた。次に、TEA以外の物質に対する輸送能を検討した(図8)。有機カチオンであるカルニチン、キニジン、ピリラミンのラベル体を用い輸送能を測定したところ、Mockに対し明らかに有意な取り込み量の増加が観察され、これらの有機カチオンはOCTN1の基質になりうることが明らかとなった。しかし、有機アニオンであるPCG(ベンジルペニシリン)に対しては取り込み量の有意な増加は認められなかった。

【0037】

[実施例7] *Xenopus*卵母細胞を用いたOCTN1の活性測定

pcDNA3/OCTN1を鋳型とし、T7 RNAポリメラーゼによりcRNAをin vitroで合成した。これを0.3ng/nlに希釈し、50nl(15ng)を一つの卵母細胞にインジェクションした。対照としては、蒸留水50nlをインジェクションした。この卵母細胞を3日間培養し、トランスポート実験に用いた。アップテイク緩衝液(0.05% Tween 80, 100mM NaCl, 2mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10 mM Hepes pH 7.4)中、25℃で20分卵母細胞をプレインキュベートした後、0.5mlのラベル体を含むアップテイク緩衝液中に移し、取り込みを開始した。25℃、1時間インキュベートした後、氷冷したアップテイク緩衝液で3回洗浄することにより反応を止めた。5% SDSで卵母細胞を可溶化した後、クリアソルI(液体シンチレーションカウンター用カクテル)3mlと混合し、放射活性を測定した。また、インキュベーション時のラベル体を含んだアップテイク緩衝液(外部液)10μlの放射活性も同様に測定した。卵母細胞中の放射活性(dpm値)と、外部液中の放射活性(dpm値)の比を取り込み活性とした。

【0038】

*Xenopus*卵母細胞を用いたトランスポート実験の結果、この系においてもOCTN1はTEAの輸送能を示すことが明らかとなった(図9)。また、TEA以外にもキニジン、メピラミン、カルニチンといった有機カチオンを輸送する能力があることが判明した。

【0039】

次に、抗癌剤などに対する輸送能を検討した。その結果、OCTN1はアクチノマイシンD、エトポシド、ビンブラスチン、ダウノマイシンを輸送する活性がある

ことが明らかとなった(図10)。これらは実際に臨床において抗癌剤として使用されている薬剤であるが、これらの薬剤の細胞内への移行メカニズム(細胞への吸収メカニズム)においてOCTN1が関与している可能性があることが強く示唆される。このことから、OCTN1により認識されやすいといった、このトランスポーターの基質特異性を利用した薬剤を設計、スクリーニングすることにより、より細胞内への吸収性が高い、有用な薬剤を効率よく開発することが可能になると考えられる。

【0040】

[実施例8] OCTN2のHEK細胞での強制発現と活性測定

OCTN2の哺乳類細胞における発現用プラスミドDNAは以下のようにして作製した。ヒト胎児腎臓由来polyA⁺ RNA(CLONTECH社製)より、SuperScriptTM II(GIBCO BRL社製)逆転写酵素を用い、一本鎖cDNAを合成した。これを鋳型とし、以下の条件でPCRを行い、それぞれOCTN2の5'側断片、及び3'側断片を増幅した。

【0041】

OCTN2の5'側断片(約800bp)の増幅には、OCTN2 3プライマー(5' GATGGATCCCGGACGGTCTTGGGTCGCCTGCTG 3' / 配列番号: 16)およびOCTN2 4プライマー(5' GATGGATCCAAATGCTGCCACATAGTTGGAGAT 3' / 配列番号: 17)を用いた。DNAポリメラーゼ - ExTaq(TaKaRa)およびdNTPとして「150 μ M 7-deaza dGTP, 50 μ M dGTP, 200 μ M dATP, 200 μ M dTTP, 200 μ M dCTP」を用い、94℃で2分、「94℃で30秒、63℃で1分、72℃で2分」を35サイクル、72℃で10分の条件でPCRを行った。また、OCTN2 3'側断片(約1.2kbp)の増幅には、OCTN2 7プライマー(5' GATGGATCCATGGGCATGCAGACAGGCTTCAGC 3' / 配列番号: 18)およびOCTN2 8プライマー(5' GATGGATCCTTCCTCTTCAGTTTCTCCCTTACT 3' / 配列番号: 19)を用いた。DNAポリメラーゼ - ExTaq(TaKaRa)およびdNTPとして「200 μ M dGTP, 200 μ M dATP, 200 μ M dTTP, 200 μ M dCTP」を用い、94℃で2分、「94℃で30秒、63℃で30秒、72℃で2分」を35サイクル、72℃で10分の条件でPCRを行った。

【0042】

これらの断片をアガロースゲル電気泳動後にゲルから切り出して精製し、それぞれpT7Blue-Tベクターにサブクローニングした。シーケンシングすることに

よりPCRエラーのないクローンを選び、両クローンを、重複する領域に存在するPst Iサイトによって連結した。これを最終的にpcDNA3ベクターのBamHIサイトに組み込み、発現用プラスミドDNA「pcDNA3/OCTN2」とした。

【0043】

pcDNA3/OCTN2を、インサートを含まないpcDNA3ベクター(Mock)及びpcDNA3/OCTN1と共に実施例6で示した方法によりHEK細胞に導入し、トランスポート実験を行った。その結果、OCTN2はカルニチンを非常に効率よく輸送する活性を持つことが判明した(図11)。一方OCTN2は、OCTN1が効率よく輸送するTEAをほとんど輸送せず、両者には明らかな基質特異性があることが明らかとなった。

【0044】

次にトランスポート緩衝液中のNaイオンをKに変更した緩衝液を用い、OCTN2のカルニチン輸送におけるNa依存性を調べた(図12)。その結果、OCTN2のカルニチンの輸送は完全にNaの存在に依存していることが明らかとなった。このことから、OCTN2はNaと基質を共輸送するタイプのトランスポーターであることが示唆された。

【0045】

【発明の効果】

本発明により、有機カチオンを輸送する新規なトランスポーター遺伝子およびタンパク質が提供された。本発明のトランスポーターは、これを介して輸送される新規なデザインの薬物の開発や、その機能異常などに起因する疾患の治療薬の開発などに有用である。

【配列表】

(2) 発明の名称：トランスポーター遺伝子

(3) 整理番号: C2-906DP1

(4) 出願番号：

(5) 出願日：

(6) 優先権のもととなった出願をした国名及び出願の番号：

日本国 平成9年特許願第260972号

(7) 優先日 1997年9月8日

(8) 配列の数: 19

配列の長さ : 551

配列の型 : アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala

1

5

Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu

10

15

20

25

Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe

30

35

40

Leu Ala Gly Thr Pro Glu His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn

45

50

55

Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn Asn Ser Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp

60

65

70

Gly Arg Glu Val Pro His Ser Cys Ser Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile

75	80	85
Ala Asn Phe Ser Ala Leu Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu		
90	95	100
Gly Gln Leu Glu Gln Glu Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln		105
110	115	120
Asp Val Tyr Leu Ser Thr Val Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu		
125	130	135
Asp Asn Trp Lys Val Pro Leu Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val		
140	145	150
Leu Leu Gly Ser Phe Val Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg		
155	160	165
Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe		
170	175	180
Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val		185
190	195	200
Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu		
205	210	215
Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu		
220	225	230
Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe		
235	240	245
Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val		
250	255	260
Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro		265
270	275	280
Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile		
285	290	295
Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe		
300	305	310

Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile
 315 320 325
 Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser
 330 335 340 345
 Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu
 350 355 360
 Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser
 365 370 375
 Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg
 380 385 390
 Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly
 395 400 405
 Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu
 410 415 420 425
 Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe
 430 435 440
 Ser Met Leu Tyr Val Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg
 445 450 455
 Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile
 460 465 470
 Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro
 475 480 485
 Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu
 490 495 500 505
 Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln
 510 515 520
 Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser
 525 530 535
 Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe

540

545

550

配列番号 : 2

配列の長さ : 2135

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 147.. 1799

特徴を決定した方法 : E

配 列

CCCCGGCTTC GCGCCCCAAT TTCTAACAGC CTGCCTGTCC CCCGGGAACG TTCTAACATC 60

CTTGGGGAGC GCCCCAGCTA CAAGACACTG TCCTGAGAAC GCTGTCATCA CCCGTAGTTG 120

CAAGTTTCGG AGCGGCAGTG GGAAGC ATG CGG GAC TAC GAC GAG GTG ATC GCC 173

Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala

1

5

TTC CTG GGC GAG TGG GGG CCC TTC CAG CGC CTC ATC TTC TTC CTG CTC 221

Phe Leu Gly Glu Trp Gly Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu

10

15

20

25

AGC GCC AGC ATC ATC CCC AAT GGC TTC AAT GGT ATG TCA GTC GTG TTC 269

Ser Ala Ser Ile Ile Pro Asn Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe

30

35

40

CTG GCG GGG ACC CCG GAG CAC CGC TGT CGA GTG CCG GAC GCC GCG AAC 317

Leu Ala Gly Thr Pro Glu His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn

45

50

55

CTG AGC AGC GCC TGG CGC AAC AAC AGT GTC CCG CTG CGG CTG CGG GAC 365

Leu Ser Ser Ala Trp Arg Asn Asn Ser Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp

60	65	70	
GGC CGC GAG GTG CCC CAC AGC TGC AGC CGC TAC CGG CTC GCC ACC ATC			413
Gly Arg Glu Val Pro His Ser Cys Ser Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile			
75	80	85	
GCC AAC TTC TCG GCG CTC GGG CTG GAG CCG GGG CGC GAC GTG GAC CTG			461
Ala Asn Phe Ser Ala Leu Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu			
90	95	100	105
GGG CAG CTG GAG CAG GAG AGC TGC CTG GAT GGC TGG GAG TTC AGC CAG			509
Gly Gln Leu Glu Gln Glu Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln			
110	115	120	
GAC GTC TAC CTG TCC ACC GTC GTG ACC GAG TGG AAT CTG GTG TGT GAG			557
Asp Val Tyr Leu Ser Thr Val Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu			
125	130	135	
GAC AAC TGG AAG GTG CCC CTC ACC ACC TCC CTG TTC TTC GTA GGC GTG			605
Asp Asn Trp Lys Val Pro Leu Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val			
140	145	150	
CTC CTC GGC TCC TTC GTG TCC GGG CAG CTG TCA GAC AGG TTT GGC AGG			653
Leu Leu Gly Ser Phe Val Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg			
155	160	165	
AAG AAC GTT CTC TTC GCA ACC ATG GCT GTA CAG ACT GGC TTC AGC TTC			701
Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe			
170	175	180	185
CTG CAG ATT TTC TCC ATC AGC TGG GAG ATG TTC ACT GTG TTA TTT GTC			749
Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val			
190	195	200	
ATC GTG GGC ATG GGC CAG ATC TCC AAC TAT GTG GTA GCC TTC ATA CTA			797
Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu			
205	210	215	
GGA ACA GAA ATT CTT GGC AAG TCA GTT CGT ATT ATA TTC TCT ACA TTA			845

Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu	
220 225 230	
GGA GTG TGC ACA TTT TTT GCA GTT GGC TAT ATG CTG CTG CCA CTG TTT	893
Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe	
235 240 245	
GCT TAC TTC ATC AGA GAC TGG CGG ATG CTG CTG CTG GCG CTG ACG GTG	941
Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val	
250 255 260 265	
CCG GGA GTG CTG TGT GTC CCG CTG TGG TGG TTC ATT CCT GAA TCT CCC	989
Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro	
270 275 280	
CGA TGG CTG ATA TCC CAG AGA AGA TTT AGA GAG GCT GAA GAT ATC ATC	1037
Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile	
285 290 295	
CAA AAA GCT GCA AAA ATG AAC AAC ACA GCT GTA CCA GCA GTG ATA TTT	1085
Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe	
300 305 310	
GAT TCT GTG GAG GAG CTA AAT CCC CTG AAG CAG CAG AAA GCT TTC ATT	1133
Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile	
315 320 325	
CTG GAC CTG TTC AGG ACT CGG AAT ATT GCC ATA ATG ACC ATT ATG TCT	1181
Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser	
330 335 340 345	
TTG CTG CTA TGG ATG CTG ACC TCA GTG GGT TAC TTT GCT CTG TCT CTG	1229
Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu	
350 355 360	
GAT GCT CCT AAT TTA CAT GGA GAT GCC TAC CTG AAC TGT TTC CTC TCT	1277
Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser	
365 370 375	

GCC TTG ATT GAA ATT CCA GCT TAC ATT ACA GCC TGG CTG CTA TTG CGA	1325
Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg	
380 385 390	
ACG CTG CCC AGG CGT TAT ATC ATA GCT GCA GTA CTG TTC TGG GGA GGA	1373
Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly	
395 400 405	
GGT GTG CTT CTC TTC ATT CAA CTG GTA CCT GTG GAT TAT TAC TTC TTA	1421
Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu	
410 415 420 425	
TCC ATT GGT CTG GTC ATG CTG GGA AAA TTT GGG ATC ACC TCT GCT TTC	1469
Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe	
430 435 440	
TCC ATG CTG TAT GTC TTC ACT GCT GAG CTC TAC CCA ACC CTG GTC AGG	1517
Ser Met Leu Tyr Val Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg	
445 450 455	
AAC ATG GCG GTG GGG GTC ACA TCC ACG GCC TCC AGA GTG GGC AGC ATC	1565
Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile	
460 465 470	
ATT GCC CCC TAC TTT GTT TAC CTC GGT GCT TAC AAC AGA ATG CTG CCC	1613
Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro	
475 480 485	
TAC ATC GTC ATG GGT AGT CTG ACT GTC CTG ATT GGA ATC TTC ACC CTT	1661
Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu	
490 495 500 505	
TTT TTC CCT GAA AGT TTG GGA ATG ACT CTT CCA GAA ACC TTA GAG CAG	1709
Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln	
510 515 520	
ATG CAG AAA GTG AAA TGG TTC AGA TCT GGG AAA AAA ACA AGA GAC TCA	1757
Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser	

525	530	535	
ATG GAG ACA GAA GAA AAT CCC AAG GTT CTA ATA ACT GCA TTC			1799
Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe			
540	545	550	
TGAAAAAATA TCTACCCCAT TTGGTGAAGT GAAAAACAGA AAAATAAGAC CCTGTGGAGA			1859
AATTCGTTGT TCCCACTGAA ATGGACTGAC TGTAACGATT GACACCAAAA TGAACCTTGC			1919
TATCAAGAAA TGCTCGTCAT ACAGTAAACT CTGGATGATT CTTCCAGATA ATGTCCTTGC			1979
TTTACAAACC AACCATTCTTCT AGAGAGTCTC CTTACTCATT AATTCAATGA AATGGATTGG			2039
TAAGATGTCT TGAAAAACATG TTAGTCAAGG ACTGGTAAAA TACATATAAA GATTAACACT			2099
CATTTCGAAT CATACAAATA CTATCCAAAT AAAAAT			2135

配列番号 : 3

配列の長さ : 557

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配 列

Met	Arg	Asp	Tyr	Asp	Glu	Val	Thr	Ala	Phe	Leu	Gly	Glu	Trp	Gly
1				5						10				15
Pro	Phe	Gln	Arg	Leu	Ile	Phe	Phe	Leu	Leu	Ser	Ala	Ser	Ile	Ile
				20				25						30
Asn	Gly	Phe	Thr	Gly	Leu	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Ile	Ala	Thr	Pro
				35				40					45	
His	Arg	Cys	Arg	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	Leu	Ser	Ser	Ala	Trp
				50				55					60	
Asn	His	Thr	Val	Pro	Leu	Arg	Leu	Arg	Asp	Gly	Arg	Glu	Val	Pro
				65				70					75	
Ser	Cys	Arg	Arg	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr	Ile	Ala	Asn	Phe	Ser	Ala
				80				85					90	
Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Gly	Gln	Leu	Glu	Gln

100	105	110
Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr		
115	120	125
Ile Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro		
130	135	140
Leu Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile		
145	150	155
Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val		
160	165	170
Thr Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys		
180	185	190
Asn Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln		
195	200	205
Ile Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly		
210	215	220
Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr		
225	230	235
Ala Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp		
240	245	250
Trp Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val		
260	265	270
Ala Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln		
275	280	285
Gly Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala		
290	295	300
Asn Gly Ile Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln		
305	310	315
Asp Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu		
320	325	330
		335

Arg Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp			
340	345	350	
Met Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn			
355	360	365	
Leu His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu			
370	375	380	
Val Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg			
385	390	395	
Arg Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu			
400	405	410	415
Phe Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu			
420	425	430	
Val Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr			
435	440	445	
Val Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val			
450	455	460	
Gly Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr			
465	470	475	
Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met			
480	485	490	495
Gly Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu			
500	505	510	
Ser Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val			
515	520	525	
Lys Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys			
530	535	540	
Asp Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe			
545	550	555	

配列番号 : 4

配列の長さ : 1831

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配 列

CGGACGGTCT TGGGTCGCCT GCTGCCTGGC TTGCCTGGTC GGCGGCGGGT GCGGCGCGCG	60
CACGCGCAAA GCGCGCCGCG TTCCCAGACC CCAGGCCGCG CTCTGTGGGC CTCTGAGGGC	120
GGC ATG CGG GAC TAC GAC GAG GTG ACC GCC TTC CTG GGC GAG TGG GGG	168
Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Thr Ala Phe Leu Gly Glu Trp Gly	
1 5 10 15	
CCC TTC CAG CGC CTC ATC TTC TTC CTG CTC AGC GCC AGC ATC ATC CCC	216
Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu Ser Ala Ser Ile Ile Pro	
20 25 30	
AAT GGC TTC ACC GGC CTG TCC TCC GTG TTC CTG ATA GCG ACC CCG GAG	264
Asn Gly Phe Thr Gly Leu Ser Ser Val Phe Leu Ile Ala Thr Pro Glu	
35 40 45	
CAC CGC TGC CGG GTG CCG GAC GCC GCG AAC CTG AGC AGC GCC TGG CGC	312
His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn Leu Ser Ser Ala Trp Arg	
50 55 60	
AAC CAC ACT GTC CCA CTG CGG CTG CGG GAC GGC CGC GAG GTG CCC CAC	360
Asn His Thr Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp Gly Arg Glu Val Pro His	
65 70 75	
AGC TGC CGC CGC TAC CGG CTC GCC ACC ATC GCC AAC TTC TCG GCG CTC	408
Ser Cys Arg Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile Ala Asn Phe Ser Ala Leu	
80 85 90 95	
GGG CTG GAG CCG GGG CGC GAC GTG GAC CTG GGG CAG CTG GAG CAG GAG	456
Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Glu	

100	105	110	
AGC TGT CTG GAT GGC TGG GAG TTC AGT CAG GAC GTC TAC CTG TCC ACC			504
Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln Asp Val Tyr Leu Ser Thr			
115	120	125	
ATT GTG ACC GAG TGG AAC CTG GTG TGT GAG GAC GAC TGG AAG GCC CCA			552
Ile Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu Asp Asp Trp Lys Ala Pro			
130	135	140	
CTC ACA ATC TCC TTG TTC TTC GTG GGT GTG CTG TTG GGC TCC TTC ATT			600
Leu Thr Ile Ser Leu Phe Phe Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Phe Ile			
145	150	155	
TCA GGG CAG CTG TCA GAC AGG TTT GGC CGG AAG AAT GTG CTG TTC GTG			648
Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg Lys Asn Val Leu Phe Val			
160	165	170	175
ACC ATG GGC ATG CAG ACA GGC TTC AGC TTC CTG CAG ATC TTC TCG AAG			696
Thr Met Gly Met Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys			
180	185	190	
AAT TTT GAG ATG TTT GTC GTG CTG TTT GTC CTT GTA GGC ATG GGC CAG			744
Asn Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln			
195	200	205	
ATC TCC AAC TAT GTG GCA GCA TTT GTC CTG GGC ACA GAA ATT CTT GGC			792
Ile Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly			
210	215	220	
AAG TCA GTT CGT ATA ATA TTC TCT ACG TTA GGA GTG TGC ATA TTT TAT			840
Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr			
225	230	235	
GCA TTT GGC TAC ATG GTG CTG CCA CTG TTT GCT TAC TTC ATC CGA GAC			888
Ala Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp			
240	245	250	255
TGG CGG ATG CTG CTG GTG GCG CTG ACG ATG CCG GGC GTG CTG TGC GTG			936

Trp Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val	
260 265 270	
GCA CTC TGG TGG TTC ATC CCT GAG TCC CCC CGA TGG CTC ATC TCT CAG	984
Ala Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln	
275 280 285	
GGA CGA TTT GAA GAG GCA GAG GTG ATC ATC CGC AAG GCT GCC AAA GCC	1032
Gly Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala	
290 295 300	
AAT GGG ATT GTT GTG CCT TCC ACT ATC TTT GAC CCG AGT GAG TTA CAA	1080
Asn Gly Ile Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln	
305 310 315	
GAC CTA AGT TCC AAG AAG CAG CAG TCC CAC AAC ATT CTG GAT CTG CTT	1128
Asp Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu	
320 325 330 335	
CGA ACC TGG AAT ATC CGG ATG GTC ACC ATC ATG TCC ATA ATG CTG TGG	1176
Arg Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp	
340 345 350	
ATG ACC ATA TCA GTG GGC TAT TTT GGG CTT TCG CTT GAT ACT CCT AAC	1224
Met Thr Ile Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn	
355 360 365	
TTG CAT GGG GAC ATC TTT GTG AAC TGC TTC CTT TCA GCG ATG GTT GAA	1272
Leu His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu	
370 375 380	
GTC CCA GCA TAT GTG TTG GCC TGG CTG CTG CTG CAA TAT TTG CCC CGG	1320
Val Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg	
385 390 395	
CGC TAT TCC ATG GCC ACT GCC CTC TTC CTG GGT GGC AGT GTC CTT CTC	1368
Arg Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu	
400 405 410 415	

TTC ATG CAG CTG GTA CCC CCA GAC TTG TAT TAT TTG GCT ACA GTC CTG	1416
Phe Met Gln Leu Val Pro Pro Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu	
420 425 430	
GTG ATG GTG GGC AAG TTT GGA GTC ACG GCT GCC TTT TCC ATG GTC TAC	1464
Val Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr	
435 440 445	
GTG TAC ACA GCC GAG CTG TAT CCC ACA GTG GTG AGA AAC ATG GGT GTG	1512
Val Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val	
450 455 460	
GGA GTC AGC TCC ACA GCA TCC CGC CTG GGC AGC ATC CTG TCT CCC TAC	1560
Gly Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr	
465 470 475	
TTC GTT TAC CTT GGT GCC TAC GAC CGC TTC CTG CCC TAC ATT CTC ATG	1608
Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met	
480 485 490 495	
GGA AGT CTG ACC ATC CTG ACA GCC ATC CTC ACC TTG TTT CTC CCA GAG	1656
Gly Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu	
500 505 510	
AGC TTC GGT ACC CCA CTC CCA GAC ACC ATT GAC CAG ATG CTA AGA GTC	1704
Ser Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val	
515 520 525	
AAA GGA ATG AAA CAC AGA AAA ACT CCA AGT CAC ACA AGG ATG TTA AAA	1752
Lys Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys	
530 535 540	
GAT GGT CAA GAA AGG CCC ACA ATC CTT AAA AGC ACA GCC TTC	1794
Asp Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe	
545 550 555	
TAACATCGCT TCCAGTAAGG GAGAACTGA AGAGGAA	1831

配列番号 : 5

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

CTAATACGAC TCACTATAGG GC 22

配列番号 : 6

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

TGTAGCGTGA AGACGACAGA A 21

配列番号 : 7

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

TCGAGCGGCC GCCCGGGCAG GT 22

配列番号 : 8

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

AGGGCGTGGT GCGGAGGGCG GT

22

配列番号 : 9

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

CTTTTGAGCA AGTTCAGCCT

20

配列番号 : 10

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

AGAGGTGGCT TATGAGTATT TCTT

24

配列番号 : 11

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

CCAGGGTTTT CCCAGTCACG AC

22

配列番号 : 12

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

TCACACAGGA AACAGCTATG AC

22

配列番号 : 13

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

GTGCTGTTGG GCTCCTTCAT TTCA

24

配列番号 : 14

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

AGCTGCATGA AGAGAAGGAC ACTG

24

配列番号 : 15

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

AGCATCCTGT CTCCTACTT CGTT 24

配列番号 : 16

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCC GGACGGTCTT GGGTCGCCTG CTG 33

配列番号 : 17

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCA AATGCTGCCA CATAGTTGGA GAT 33

配列番号 : 18

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCA TGGGCATGCA GACAGGCTTC AGC 33

配列番号 : 19

配列の長さ : 33

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

GATGGATCCT TCCTCTTCAG TTTCTCCCTT ACT

33

【図面の簡単な説明】

【図 1】

OCTN1とOCTN2の疎水性プロットを示す。Kyte&Doolittleの計算式による。Windowサイズは9アミノ酸である。数字は予想される膜貫通領域を示す。

【図 2】

OCTN1のノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

【図 3】

OCTN1とOCTN2のアミノ酸配列の比較を示す。糖トランスポーターのコンセンサス配列に一致する配列を「+」で、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列に一致する配列を「*」で示す。

【図 4】

OCTN2のノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

【図 5】

OCTN1のTEAの吸収活性を示す。白丸は未処理の細胞、黒丸はOCTN1を導入した細胞を示す。

【図 6】

図 5 の実験系に対するコールドTEAの添加による影響を示す。図中の黒丸はOCTN1を導入した細胞、白丸はインサートを含まないベクターを導入した細胞、白三角は黒丸の値から白丸の値を差し引いた、正味のOCTN1による取り込み量を指す。

【図 7】

OCTN1におけるTEA吸収活性のTEA濃度依存性を示す。

【図 8】

OCTN1を導入した細胞におけるTEA以外の物質の吸収活性を示す図である。

【図 9】

Xenopus卵母細胞を用いたトランスポート実験の結果を表す。OCTN1、Waterと示したバーはそれぞれ、OCTN1 cRNAをインジェクトした場合、及びcRNAを含まない水をインジェクトした場合の取り込み活性を示す。OCTN1 cRNAをインジェクトした卵母細胞へのTEA、カルニチン、メピラミン、及びキニジン及びアクチノマイシンDの取り込みが観察された。一方、cRNAを含まない水をインジェクトした卵母細胞はほとんど取り込み活性を示さなかった。

【図 10】

Xenopus卵母細胞を用いた抗癌剤のトランスポート実験の結果を表す。OCTN1、Waterと示したバーはそれぞれ、OCTN1 cRNAをインジェクトした場合、及びcRNAを含まない水をインジェクトした場合の取り込み活性を示す。OCTN1 cRNAをインジェクトした卵母細胞へのアクチノマイシンD、エトポシド、ビンブラスチン、及びダウノマイシンの取り込みが観察された。

【図 11】

HEK293細胞におけるOCTN1とOCTN2のトランスポート実験の結果を表す。OCTN1はTEAを、またOCTN2はカルニチンを効率よく輸送する活性を持つことがわかる。

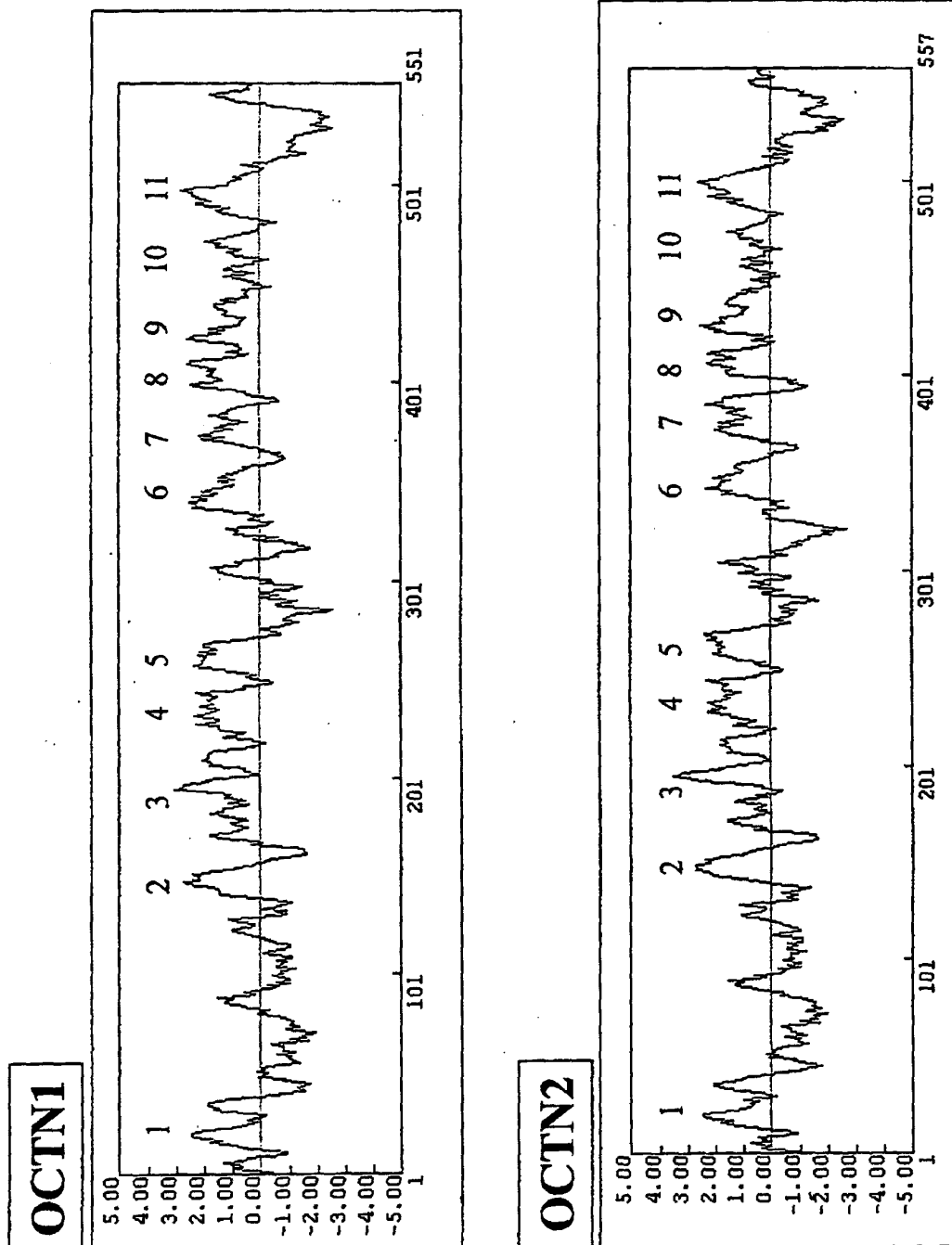
【図 12】

OCTN2のカルニチン輸送活性に対するNaの依存性を調べた結果を示す。OCTN2はNa存在下、時間に依存したカルニチンの輸送活性を示す（白丸）が、この活性はNa非存在下には全く見られず（黒丸）、OCTN2のカルニチン輸送活性はNaの存在に依存していることがわかる。

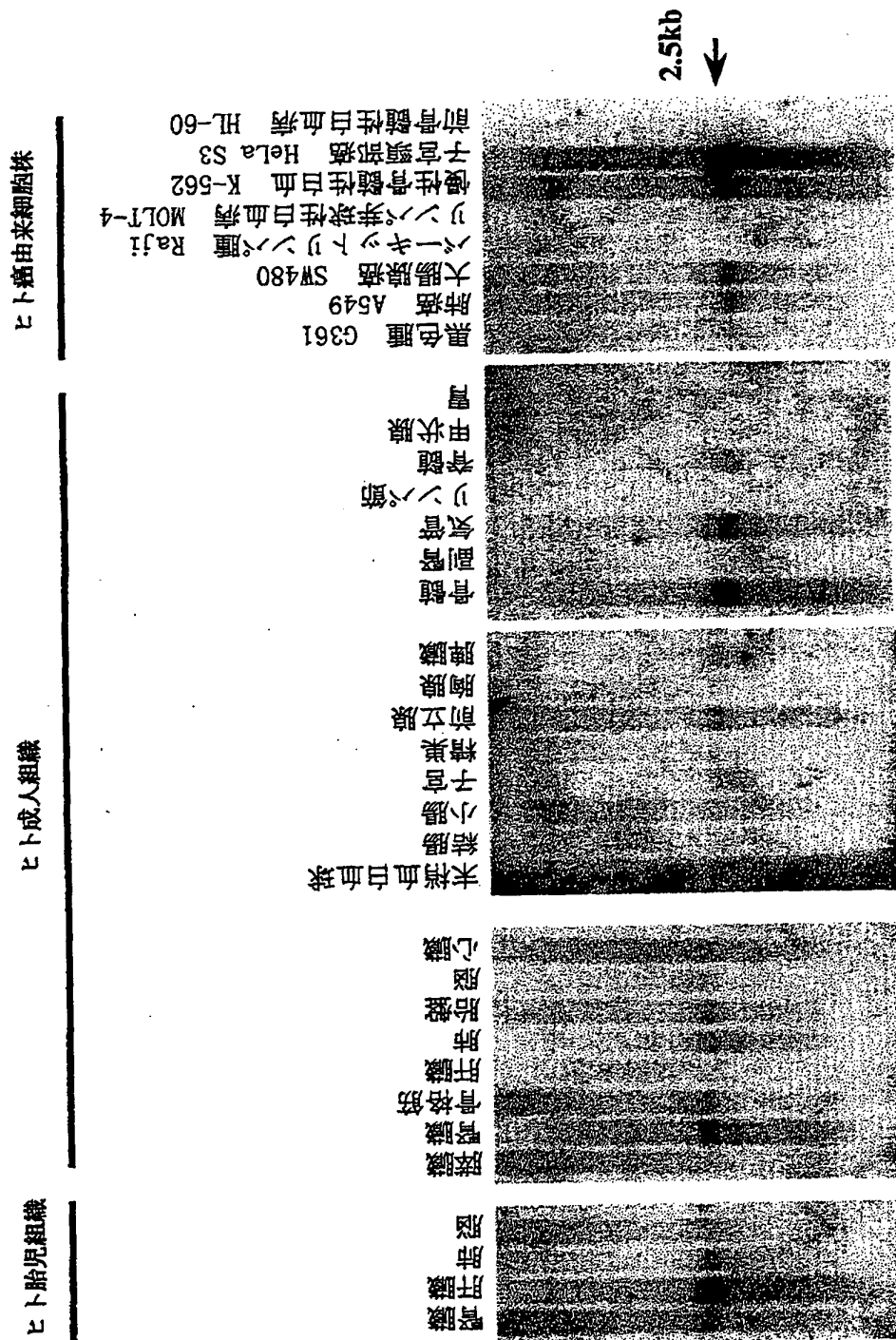
【書類名】

図面

【図1】



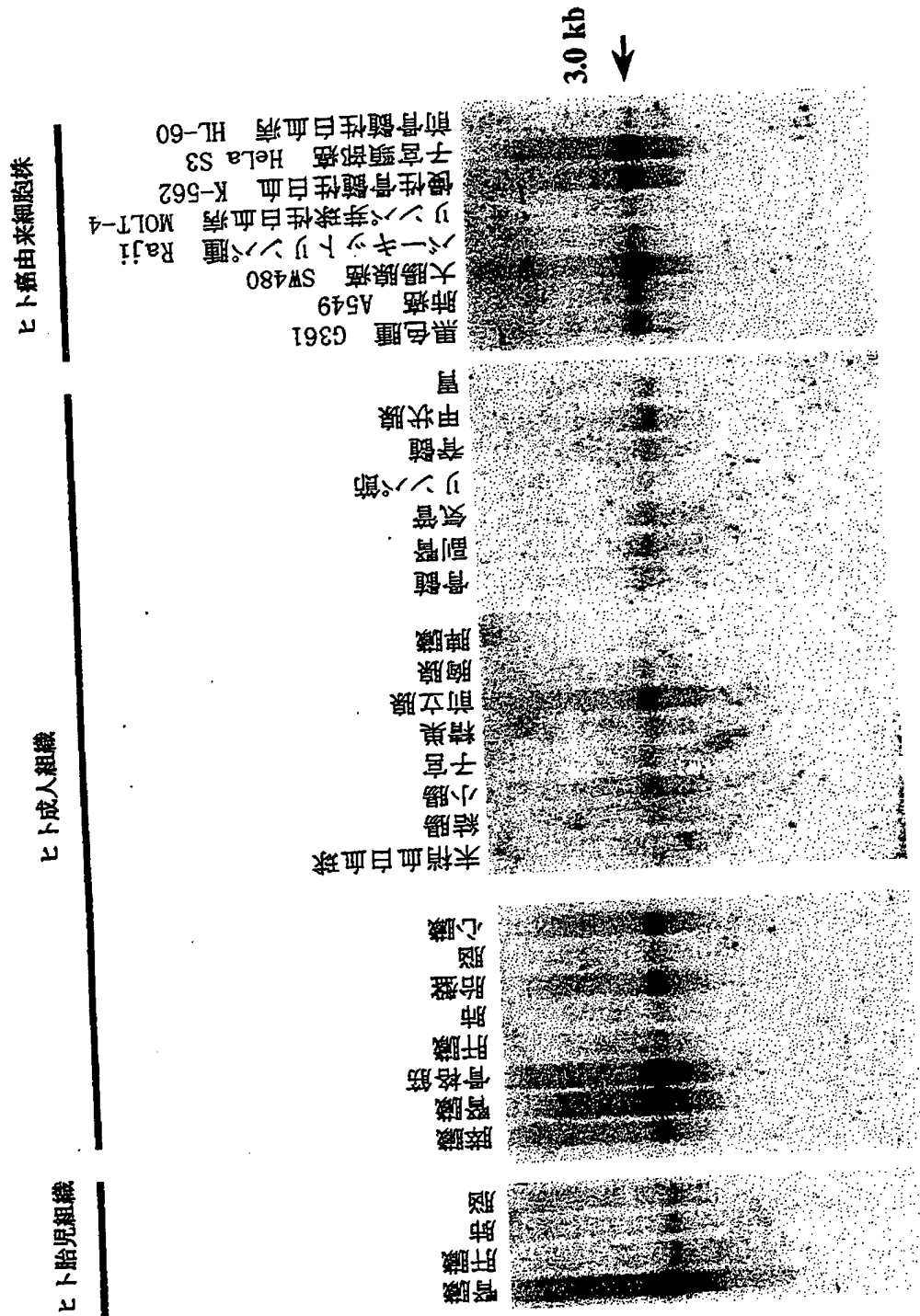
【図 2】



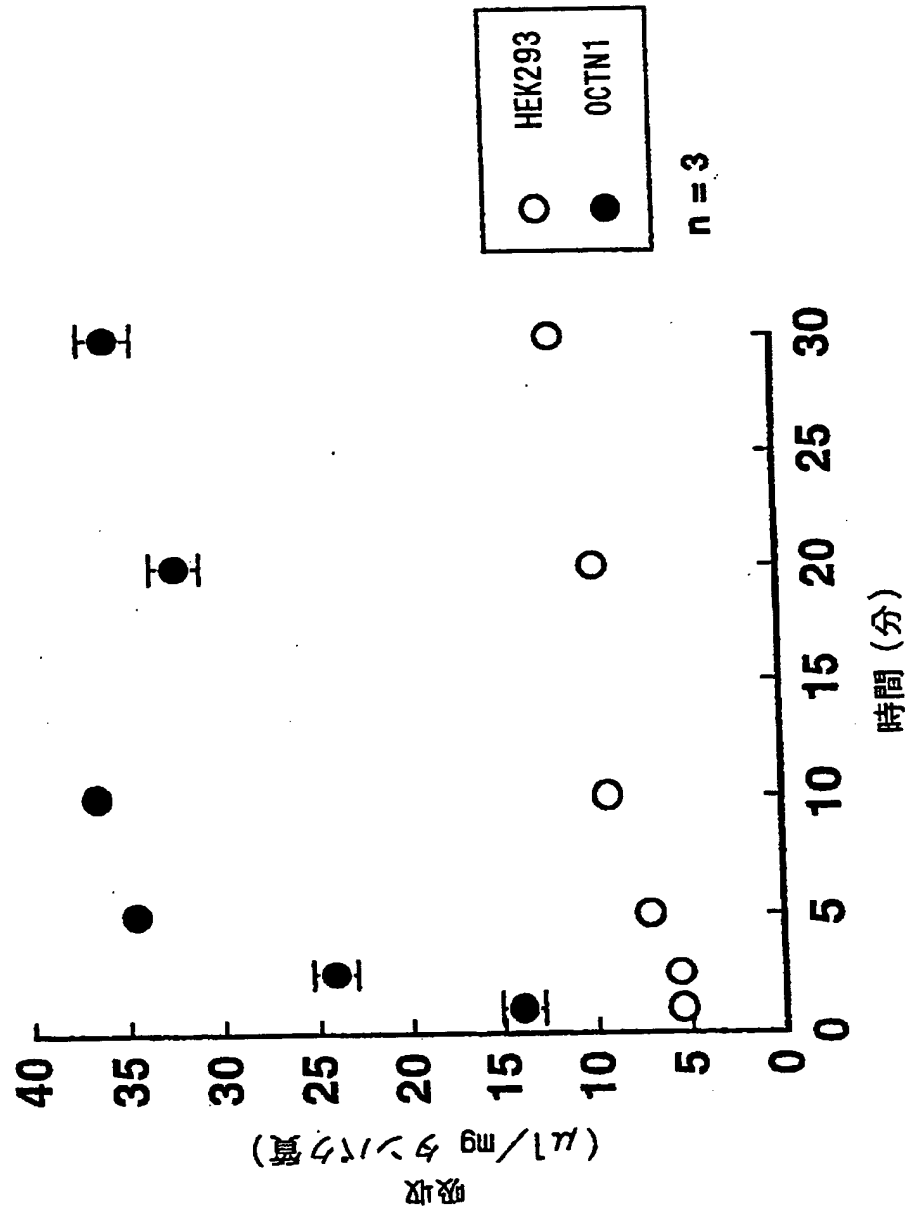
【図 3】

OCTN1	1	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN2	1	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN1	101	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN2	101	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN1	201	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN2	201	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN1	301	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN2	301	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN1	399	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN2	401	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN1	499	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC
OCTN2	501	RDVDEGQLEK	EGENGRORU	ERHESISIL	ENGCHDSV	ACACPEIR	RPDANESS	AVWNSPDR	ERDORPHS	CSRIRATA	NESALGPRC

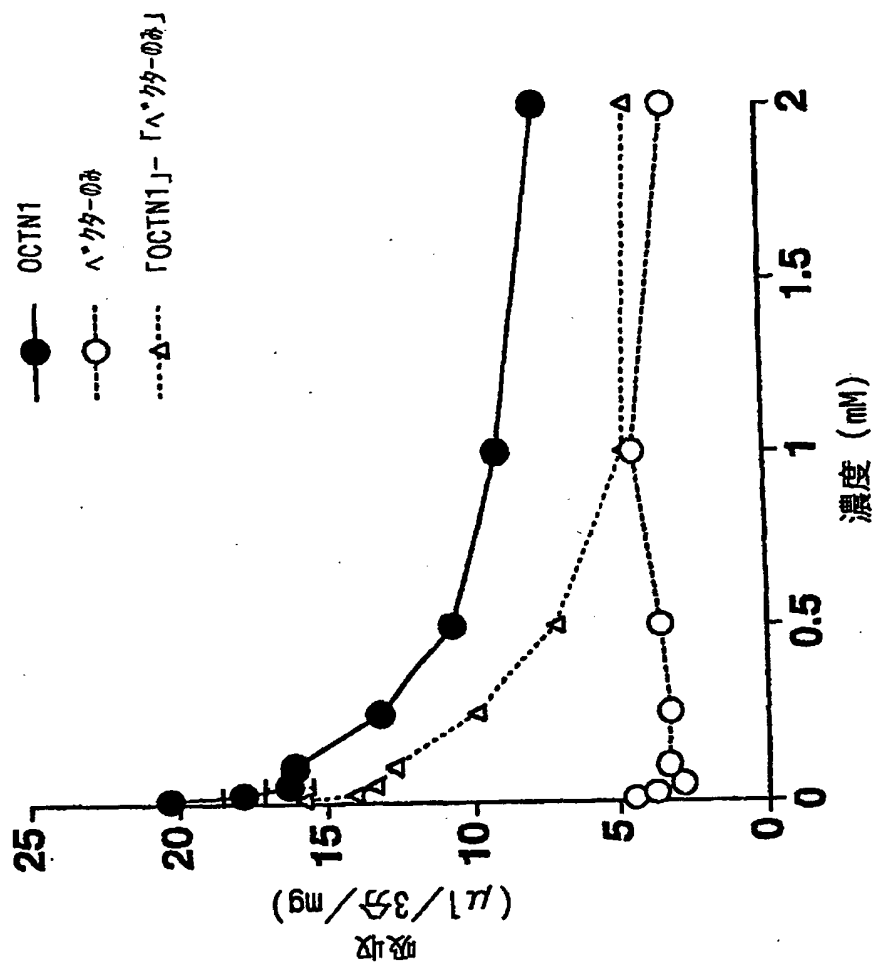
【図 4】



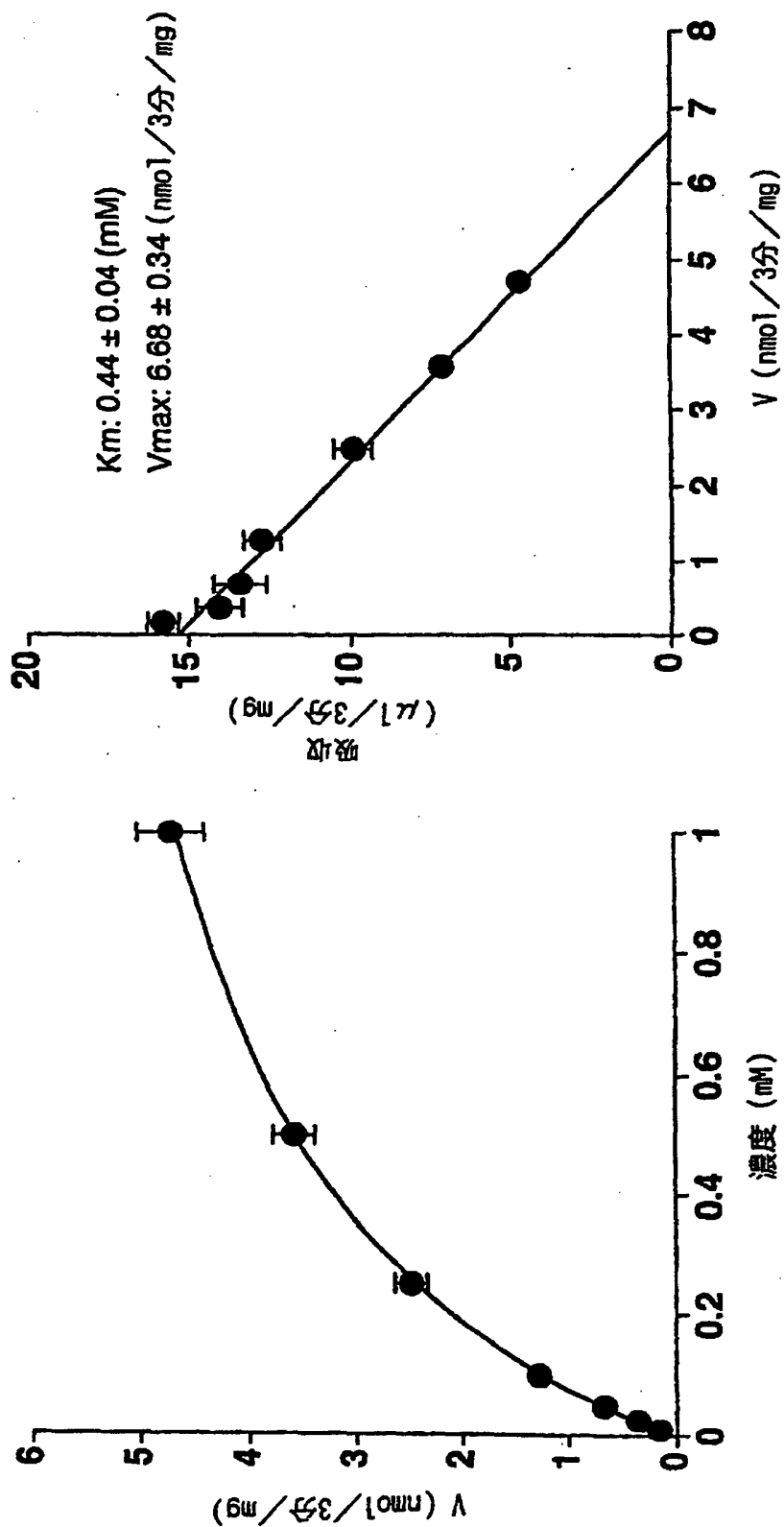
【図 5】



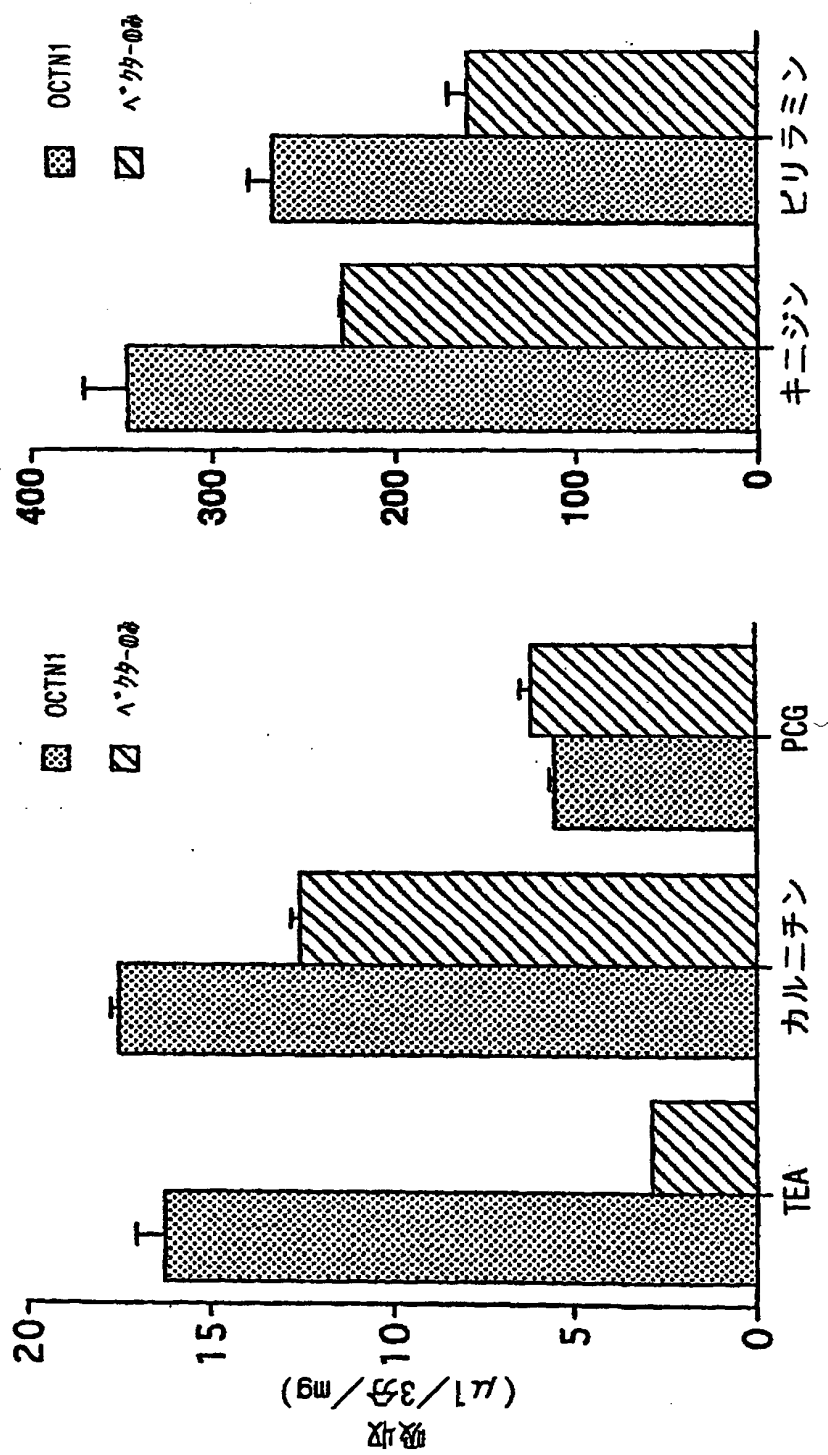
【図 6】



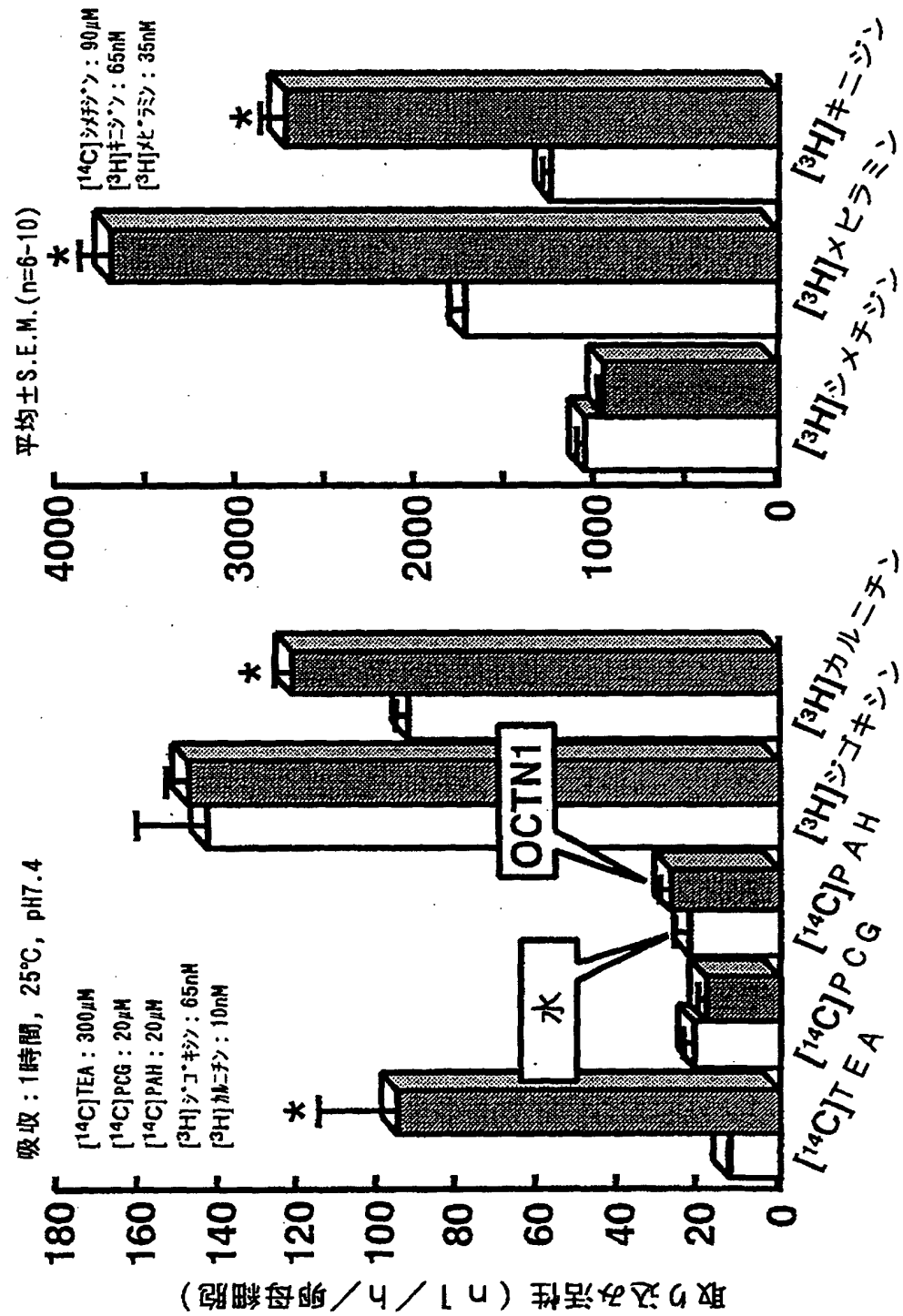
【図 7】



【図 8】

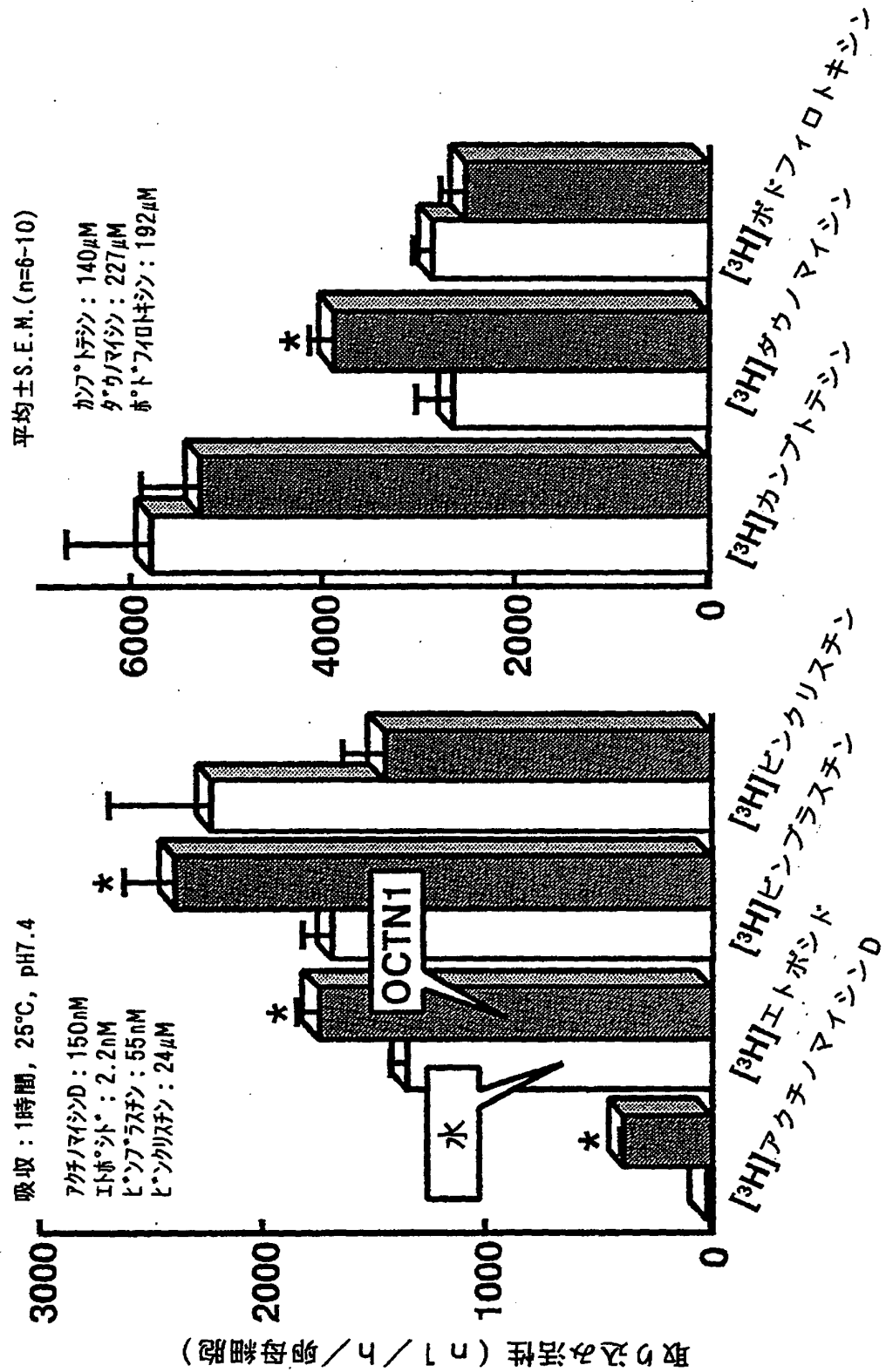


【図9】

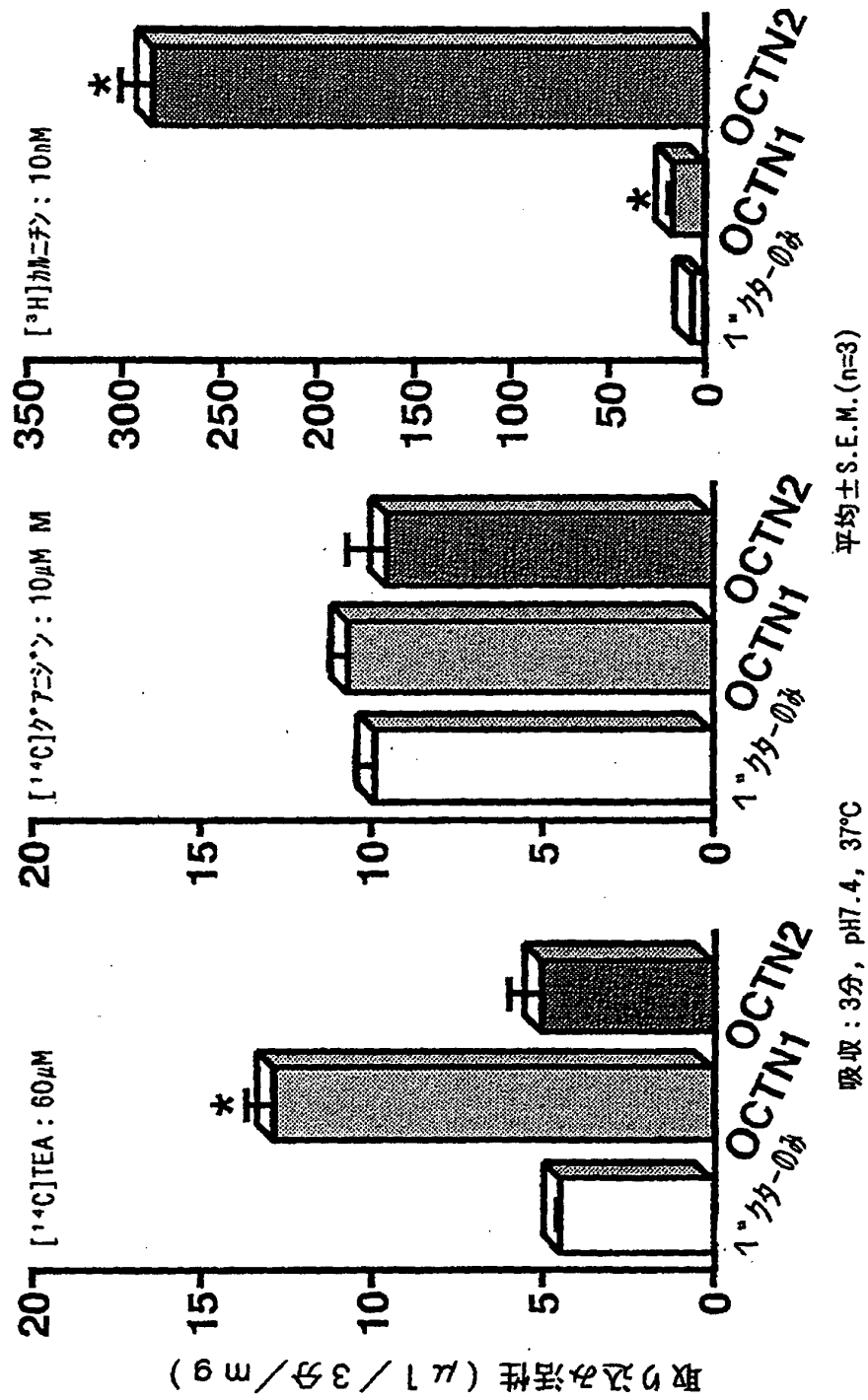


特平 1 0 - 1 5 6 6 6 0

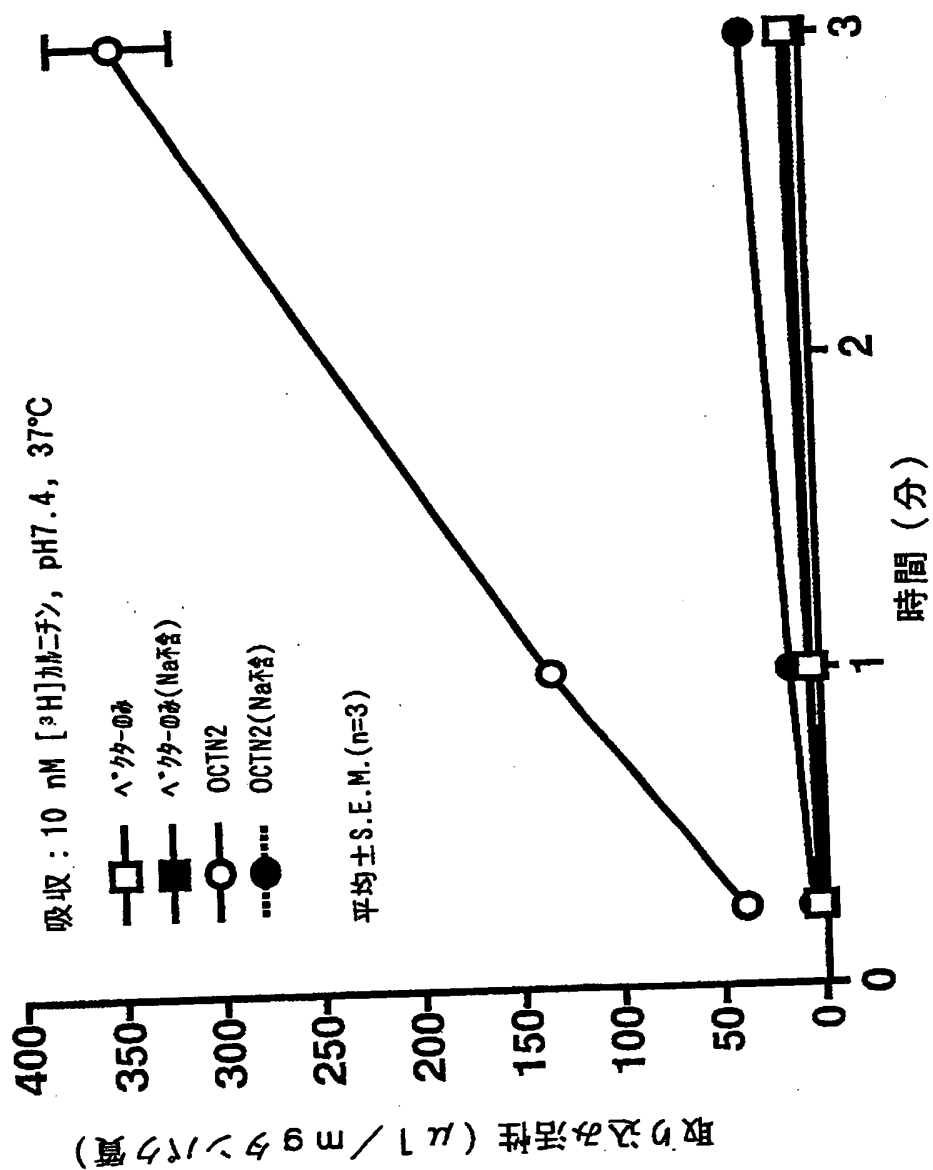
【図 1 0】



【図11】



【図 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なトランスポーター遺伝子およびそのタンパク質を提供することを課題とする。

【解決手段】 胎児遺伝子 (fetal gene) ライブラリーの、ランダムシーケンシングによるスクリーニングを行い、有機カチオントランスポーターOCT1およびOCT2と有意な相同性を示す未知の遺伝子の存在を見いだした。この遺伝子が新規のトランスポーターをコードしていることが予想されたことから、その単離を試み、ヒト胎児由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより目的の遺伝子を単離することに成功した。さらに、単離した遺伝子がコードするタンパク質のトランスポーター活性につき検討を行った結果、該タンパク質が実際に種々の有機カチオンのトランスポーターとして機能することを見いだした。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

596102791

【住所又は居所】

茨城県新治郡新治村永井 153 番地 2

【氏名又は名称】

株式会社中外分子医学研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】

100102978

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】

100108774

【住所又は居所】

茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階

清水国際特許事務所

【氏名又は名称】

橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2

氏 名 株式会社中外分子医学研究所